

Title	PGAP2 Is Essential for Correct Processing and Stable Expression of GPI-anchored Proteins
Author(s)	田嶋, 優子
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	https://hdl.handle.net/11094/46277
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について ご参照 ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

氏 名 田 鳥 優 子

博士の専攻分野の名称 博 士 (医 学)

学 位 記 番 号 第 20096 号

学 位 授 与 年 月 日 平成 18 年 3 月 24 日

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第4条第1項該当

医学系研究科生体制御医学専攻

学 位 論 文 名 PGAP2 Is Essential for Correct Processing and Stable Expression of GPI-anchored Proteins
(PGAP2 は、哺乳細胞において、GPI-アンカー型蛋白質が正しいプロセッシングを受けて、細胞表面に安定に発現するのに必須である。)

論 文 審 査 委 員 (主査)

教 授 木下タロウ

(副査)

教 授 谷口 直之 教 授 岡本 光弘

論 文 内 容 の 要 旨

〔 目 的 〕

Glycosylphosphatidylinositol (GPI) アンカー型蛋白質は、膜貫通領域を持たず、糖脂質 GPI により細胞表面に繋ぎ止められている。このような GPI アンカー型蛋白質は、酵素、補体制御、接着分子など様々な働きをする。GPI は、小胞体にてホスファチジルイノシトールに3つのマンノース、グルコサミン、エタノールアミンが順番に付加して合成される。その後、GPI は小胞体で蛋白質と結合し、完成した GPI アンカー型蛋白質はゴルジを経て、細胞表面に運ばれ、特にラフトに多く分布する。GPI は、ラフトへの局在を決める因子として重要な働きをしている。現在までに、GPI 合成に関わる多くの遺伝子が明らかにされてきた。しかし、GPI アンカー蛋白質が小胞体で完成した後にどのような遺伝子とその細胞表面への発現に関与しているのかは、よくわかっていない。GPI 生合成以降のステップにかかわる因子を見つけることを目的として、GPI 生合成は正常だが、細胞表面に GPI アンカー型蛋白質を発現していない変異細胞株を樹立して解析した。

〔 方法ならびに成績 〕

CHO 細胞に GPI アンカー型蛋白質であるヒト CD59 と DAF を過剰発現させた 3B2A 細胞を変異原 ethyl methane sulfonate で処理した後、GPI アンカーに結合し細胞を殺すことが知られている毒素と CD59 ネガティブ細胞のセルソーティングという2種類の方法を用いて、CD59 と DAF を細胞表面に発現しない変異細胞株を樹立した。それらの中から、GPI 生合成に関わる既知の遺伝子で CD59 や DAF の発現を回復しない、新しい異常細胞株 AM-B と Clone84 を樹立した。両者ともメタボリックラベルにより GPI の生合成には異常がないことを確認した。

発現クローニング法により、これらの変異細胞の責任遺伝子 *Post GPI Attachment to Proteins 2* (PGAP2) を同定した。PGAP2 は、254 個のアミノ酸からなる膜型蛋白質で、ほ乳細胞でよく保存されていた。しかし、PGAP2 には機能を示唆するような保存されたドメインがなく、その機能は明らかでない。PGAP2 の局在が主にゴルジであることを確認した。

PGAP2 変異細胞では、GPI アンカー型蛋白質の細胞膜上の発現が特異的に低下している一方、GPI アンカー型以

外の膜型蛋白質の発現は正常であった。メタボリックラベルを用いた pulse-chase 実験から、変異細胞の GPI アンカー型蛋白質の発現低下は、培養上清に分泌されるためであることがわかった。さらに、タンニン酸による細胞膜への輸送阻害と Triton X-114 相分離による疎水性の検定を組み合わせた実験により、GPI アンカー型蛋白質が細胞表面に輸送された後に膜から遊離され分泌されることを明らかにした。

次に、分泌された GPI アンカー型蛋白質の GPI の切断部位を LC-ESI MS/MS 法で調べた。切断部位は、イノシトールとリン酸の間で、ホスホリパーゼ D (PLD) の切断部位と同じであった。また、分泌された GPI アンカー型蛋白質の GPI の糖鎖構造は正常であった。

主にゴルジに局在する PGAP2 の異常で、GPI が細胞表面で PLD により切断されるメカニズムを解明するために、変異細胞でトランスゴルジネットワーク (TGN) に集積させた GPI アンカー蛋白質の脂質部分の構造を検討した。TGN から GPI アンカー型蛋白質を集め、疎水性カラムへの結合力を正常細胞の GPI アンカー型蛋白質と比較した。その結果、PGAP2 変異細胞では、ポストゴルジにある GPI の脂質部分は脂肪酸がひとつであることがわかった。

以上の結果より、PGAP2 の欠損で、GPI アンカー型蛋白質は 2 段階の切断を受けて細胞表面から分泌されることが明らかとなった。はじめに、GPI アンカー型蛋白質は PLA により細胞内でリゾ体となり、次に PLD により細胞表面から遊離された。

[総 括]

今までに小胞体における GPI の生合成経路について詳しく解明されてきたが、今回初めて完成型 GPI アンカー型蛋白質の GPI 部分の修飾に関与し、かつ小胞体以外に局在する GPI に関与する因子を見つけた。

論文審査の結果の要旨

GPI アンカー型蛋白質は、小胞体で合成された後、ゴルジ体を通して細胞表面に運ばれる。現在までに、GPI 部分の生合成に関わる多くの遺伝子が明らかにされてきた。しかし、GPI アンカー型蛋白質が細胞表面に発現するまでにどのような因子が関与しているのかは、よくわかっていない。本研究は、GPI 生合成以降のステップにかかわる因子を見つけることを目的とした。

GPI 生合成は正常だが、細胞表面に GPI アンカー型蛋白質を発現していない変異細胞株を樹立し、その責任遺伝子、PGAP2 を同定した。PGAP2 は、主にゴルジ体に局在する膜型蛋白質であった。PGAP2 欠損株で、GPI アンカー型蛋白質は、トランスゴルジネットワークを出発する以前にホスホリパーゼ A による切断を受けて GPI の脂肪酸を一つ失ったリゾ体となり、そのまま細胞表面に運ばれてホスホリパーゼ D の切断を受けて培養上清に分泌されることが明らかになった。この結果は、GPI アンカー型蛋白質が細胞表面で安定に発現するためには、PGAP2 の関わる正しい脂質部分のプロセッシングを受ける必要があることを示した。

以上の成果は、完成型 GPI アンカー型蛋白質の GPI 部分の修飾に関与し、かつ小胞体以外に局在する GPI に関与する因子を初めて見つけたものであり、学位に値すると考える。